

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-175695

(43)Date of publication of application : 27.06.2000

(51)Int.CI.

C12P	21/00
C07K	1/34
C12N	1/20
C12N	9/10
// C12N	15/09
(C12P	21/00
C12R	1:19)
(C12N	1/20
C12R	1:19)
(C12N	9/10
C12R	1:19)

(21)Application number : 10-354665

(71)Applicant : INST OF PHYSICAL & CHEMICAL
RES

(22)Date of filing : 14.12.1998

(72)Inventor : YOKOYAMA SHIGEYUKI
KIKAWA TAKANORI
YABUKI TAKASHI

(54) PRODUCTION OF POLYPEPTIDE BY ACCELLULAR PROTEIN SYNTHETIC SYSTEM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for producing a polypeptide in a short period of time in a large synthetic amount at a low cost by producing the polypeptide by intermediating a transcription, translation, or the like., of a nucleic acid encoding the polypeptide in an acellular protein synthetic system containing a concentrated cellular extract.

SOLUTION: This method for producing a polypeptide in a shorter period of time in a large synthetic amount and at a low cost by an acellular protein synthetic system using a dialysis method comprises producing the polypeptide by intermediating a translation or a transcription/translation of a nucleic acid encoding the polypeptide in the acellular protein synthetic system containing a concentrated cellular extract and performing a shaking or an agitation dialysis of the acellular protein synthetic system consisting of a synthetic reaction liquid containing the cellular extract as an inner liquid of the dialysis and a polypeptide synthetic substrate solution as an outer liquid of the dialysis, which system is separated by a dialysis membrane enabling the mass transfer of the inner liquid and the outer liquid to recover the polypeptide.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 19.03.2001

[Date of sending the examiner's decision of
rejection] 24.11.2004[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-175695

(P2000-175695A)

(43)公開日 平成12年6月27日 (2000.6.27)

(51)Int.Cl.⁷
C 12 P 21/00
C 07 K 1/34
C 12 N 1/20
9/10
// C 12 N 15/09

識別記号

F I
C 12 P 21/00
C 07 K 1/34
C 12 N 1/20
9/10
C 12 N 15/00

テマコード(参考)
C 4 B 0 2 4
4 B 0 5 0
A 4 B 0 6 4
4 B 0 6 5
A 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数12 O.L (全8頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10-354665

(22)出願日 平成10年12月14日 (1998.12.14)

(71)出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢2番1号

(72)発明者 横山 茂之

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所

内

(72)発明者 木川 隆則

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所

内

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

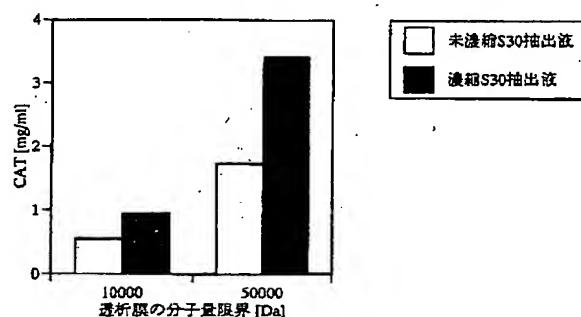
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 無細胞タンパク質合成系によるポリペプチドの製造方法

(57)【要約】

【課題】 無細胞タンパク質合成系において、従来法と比べて、より短時間に、より高い合成量かつより低コストでポリペプチドを合成するための方法を提供すること。

【解決手段】 透析法を用いた無細胞タンパク質合成系によるポリペプチドの製造方法において、濃縮細胞抽出液を含む無細胞タンパク質合成系中で該ポリペプチドをコードする核酸の翻訳又は転写/翻訳を介して該ポリペプチドを生成し、該ポリペプチドを回収することを含む方法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】透析法を用いた無細胞タンパク質合成系によるポリペプチドの製造方法において、濃縮細胞抽出液を含む無細胞タンパク質合成系中で該ポリペプチドをコードする核酸の翻訳または転写／翻訳を介して該ポリペプチドを生成し、該ポリペプチドを回収することを含む前記方法。

【請求項2】濃縮細胞抽出液を含有するポリペプチド合成反応液を透析内液とし、ポリペプチド合成基質溶液を透析外液として含み、かつ該透析内液と該透析外液が物質移動を可能とする透析膜によって隔離されている該無細胞タンパク質合成系を振とうまたは攪拌することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】前記透析外液を反応速度が低下した時点で新鮮なものと交換することをさらに含むことを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】前記透析膜が10000ダルトンを超える分子量限界をもつことを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】前記濃縮細胞抽出液が大腸菌、小麦胚芽、ウサギ網赤血球、マウスL細胞、エールリッヒ腹水癌細胞、HeLa細胞、CHO細胞、出芽酵母などの真核または原核細胞の濃縮細胞抽出液であることを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】前記濃縮細胞抽出液が濃縮大腸菌S30細胞抽出液であることを特徴とする請求項5に記載の方法。

【請求項7】前記濃縮細胞抽出液が、前記真核または原核細胞の粗細胞抽出液を透析、限外濾過、PEG沈殿などの濃縮法によって濃縮して得られることを特徴とする請求項5または6に記載の方法。

【請求項8】前記濃縮細胞抽出液が、振とうまたは攪拌可能な閉鎖系で、大腸菌A19株(r n a, m e t)から既知の方法で得られた大腸菌S30抽出液を透析内液とし、分子量限界1000～14000の透析膜を介して透析外液に対して透析を行うことによって得られるものであることを特徴とする請求項7に記載の方法。

【請求項9】前記透析外液が、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、ジチオトレイトールを含有する緩衝液と、ポリエチエングリコール、もしくはショ糖／エピクロルヒドリン水溶性合成共重合体、とを含むものであることを特徴とする請求項8に記載の方法。

【請求項10】前記無細胞タンパク質合成系が、ATP再生系としてクレアチンキナーゼとクレアチンホスフェートの組合せを含むことを特徴とする請求項1～9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】透析法を用いた無細胞タンパク質合成系によるポリペプチドの製造方法において、大腸菌由來の細胞抽出液ならびにATP再生系としてのクレアチンキナーゼとクレアチンホスフェートの組合せを含む無

細胞タンパク質合成系中で該ポリペプチドをコードする核酸の翻訳または転写／翻訳を介して該ポリペプチドを生成し、該ポリペプチドを回収することを含む前記方法。

【請求項12】前記細胞抽出液が大腸菌S30細胞抽出液であることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、透析法を用いた無細胞タンパク質合成系によるポリペプチドの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】無細胞タンパク質合成系は、細胞抽出液を用いて試験管内でタンパク質を合成する系である。細胞抽出液としては、主に大腸菌、小麦胚芽、ウサギ網赤血球由来のものが使用される。無細胞タンパク質合成系は、系を容易に改変することができるため、目的のタンパク質に適した発現系を構築しやすい。また、PCRを用いて作成したリニアDNAを鋳型として用いることができる。これにより、生細胞による発現系にて必要とされた、ベクターへのライゲーション、トランスフォーメーション、培養、集菌、溶菌といった時間と手間のかかる工程が一切不要となり、短時間で容易にタンパク質を発現することができる。しかし、タンパク質合成量が少ない欠点があり、応用が限られていた。

【0003】無細胞タンパク質合成系の合成量改善は1960年代に合成系が発表されてから今日まで続けられてきた。合成系が開発された当時の試験管内の反応法(バッチ法)の無細胞タンパク質合成系はタンパク質合成量が少なく、ラジオアイソトープ標識により発現が確認できる程度のものであった。合成量改善の歴史で一大転機となったのは1988年Spirinらによるフロー法の開発である(Science 1988, 242, 1162-1164; 特表平1-503119号公報)。これは、タンパク質合成のための基質であるアミノ酸、ATP、GTP等をポンプにより連続的に供給し、同時に限外濾過膜を介して流出した反応液より反応産物の回収を連続的に行うという方法である。フロー法によりそれまで数時間で停止していた合成反応の継続時間が数十時間に延長された。これに伴いタンパク質の合成量は飛躍的に増大し、1mlの反応液あたり100μgのタンパク質の生産が可能となった。この結果を受けて、無細胞タンパク質合成系はタンパク質の発現系として注目を浴びることになる。その後、いくつかのグループによりフロー法の報告がなされた(特開平4-200390号公報)。しかし、フロー法にはタンパク質合成量の割に大量の基質が必要である、膜が目詰まりして反応が停止しやすい、特殊な装置が必要であるという問題点があった。

【0004】近年、透析膜を介した拡散により、基質を

供給しながら同時に合成を行うシステムが報告された。Kim と Choi (Biotechnol. Prog. 1996, 12, 645-649) は、透析膜を底に張ったチャンバーを開発し、このチャンバーを基質溶液に漬けてタンパク質合成を行った。Davisら (Promega Notes Magazine Number 56, 1996, p. 14-18, Promega Corporation) は、市販の透析ユニットを利用しこれにより、フロー法と比較して簡便な装置を用いて合成反応持続時間の延長が可能であることが示された。

【0005】装置の変更だけでなく、細胞抽出液や組成の変更による合成量改善法も検討された。反応に用いる細胞抽出液を限外濾過遠心により濃縮することにより、合成速度の向上が報告されている (Nakanoら, Biosci. Biotech. Biochem., 58, 631-634; Kimら, Eur. J. Biochem. 239, 881-886 (1996))。また、大腸菌由来の無細胞タンパク質合成系において、ATP再生系として従来用いられていたホスホエノールビルペート (PEP) とビルビン酸キナーゼ (PK) の組合せを、クレアチンホスフェート (CP) とクレアチンキナーゼ (CK) の組み合わせに変更し、さらに、他の反応液組成の最適化によりバッチ法でも 1 ml の反応液あたり数百 μ g (Yabukiら, Journal of Biomolecular NMR, 11: 295-306, 1998) の生産量である。ここで、PEP、CP はいずれも ATP 再生のための基質であり、また PK、CK はいずれも ADP を ATP に再生する酵素である。PK、CK はそれぞれ PEP、CP を基質として必要とする。現在までに、無細胞タンパク質系で得られた最大の合成量は Kim と Choi (上掲) による 14 時間で 1.2 mg/m1 である。合成速度は 1 時間あたり約 80 μ g/m1 で、使用した基質 1 ml あたりの合成量は約 100 μ g であった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、無細胞タンパク質合成系において従来法よりも、より短時間に、より高い合成量でかつより低コストでポリペプチドを製造するための方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、透析法を用いた無細胞タンパク質合成系によるポリペプチドの製造方法において、濃縮細胞抽出液を含む無細胞タンパク質合成系中で該ポリペプチドをコードする核酸の翻訳または転写/翻訳を介して該ポリペプチドを生成し、該ポリペプチドを回収することを含む方法を提供する。

【0008】本発明において、上記方法は、濃縮細胞抽出液を含有するポリペプチド合成反応液を透析内液としポリペプチド合成基質溶液を透析外液として含み、かつ

該透析内液と該透析外液が物質移動を可能とする透析膜によって隔離されている該無細胞タンパク質合成系を振とうまたは攪拌することを含むことができる。本発明において、上記無細胞タンパク質合成系の透析外液は反応速度が低下した時点で新鮮なものと交換することができる。本発明において、透析膜は 10000 ダルトンを超える分子量限界、好ましくは約 50000 ダルトンおよびそれ以上の分子量限界をもつことができる。

【0009】本発明において、濃縮細胞抽出液は大腸菌、小麦胚芽、ウサギ網赤血球、マウス L-細胞、エーラリッヒ腹水癌細胞、HeLa 細胞、CHO 細胞、出芽酵母などの真核、原核細胞の粗細胞抽出液を濃縮したものである。本発明の実施態様において、そのような濃縮細胞抽出液は大腸菌 S 30 細胞抽出液を濃縮したものである。濃縮細胞抽出液は、上記の粗細胞抽出液を透析、限外濾過、ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿などの濃縮法によって濃縮して得ることができる。例えば、大腸菌 S 30 細胞抽出液の濃縮は、振とうまたは攪拌可能な閉鎖系で、大腸菌 A 19 株 (rna, met) から既知の方法 (Zubayら (1973) Ann. Rev. Genet. 7: 267-287) で得られた大腸菌 S 30 抽出液 (Promega 社からも入手可能) を透析内液とし、分子量限界 1000 ~ 14000 の透析膜を介して透析外液に対して透析を行うことによって得ることができる。ここで、透析外液は、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、ジチオトレイトールを含有する緩衝液と、ポリエチレングリコール、もしくはショ糖/エピクロルヒドリン水溶性合成共重合体 (例えば S I GM A 社製の F ico 11)、とを含むことができる。

【0010】本発明において、上記無細胞タンパク質合成系は ATP 再生系としてクレアチンキナーゼとクレアチンホスフェートの組合せを含むことができる。本発明はさらに、透析法を用いた無細胞タンパク質合成系によるポリペプチドの製造方法において、大腸菌由来の細胞抽出液ならびに ATP 再生系としてのクレアチンキナーゼとクレアチンホスフェートの組合せを含む無細胞タンパク質合成系中で該ポリペプチドをコードする核酸の翻訳または転写/翻訳を介して該ポリペプチドを生成し、該ポリペプチドを回収することを含む方法を提供する。大腸菌由来の細胞抽出液は濃縮されていてもよいしあるいは未濃縮であってもよい。本発明の実施態様において、上記細胞抽出液は大腸菌 S 30 細胞抽出液である。

【0011】本明細書でいう「無細胞タンパク質合成系」は、mRNA の情報を読み取ってリボソーム上でポリペプチドを合成する無細胞翻訳系、DNA を錆型として RNA を合成する無細胞転写系と無細胞翻訳系の両者を含むものを包含する。本明細書でいう「濃縮細胞抽出液」は、リボソーム、tRNA などのタンパク質合成に必要な成分を含む真核および原核生物細胞の粗抽出液を

透析、限外濾過、PEG沈殿 (H. Nakanoら, *Journal of Biotechnology*, 46 (1996) 275-282) などの既知の濃縮法または新規に見出される濃縮法によって濃縮されたものを意味し、該抽出液はタンパク質インヒボ合成に関与する翻訳系または転写系/翻訳系の成分を含む。「濃縮」は、抽出液中の総タンパク質濃度を指標として、その濃度の増加を意味する。

【0012】本明細書でいう「ポリペプチド」は、複数のアミノ酸残基から構成される任意の分子量のペプチド、すなわち低分子量(小ペプチド)から高分子量(タンパク質を含む大ペプチド)のいずれも包含するものとする。本明細書でいう「核酸」とはRNA、mRNA、DNA、cDNAのいずれかを指す。

【0013】

【発明の実施の形態】以下に本発明を詳細に説明する。本発明者らは、透析を用いた無細胞タンパク質合成法において、透析内液中に粗細胞抽出液の濃縮液を用いるときに、未濃縮の抽出液を用いたときと比べて著しくポリペプチドの生産量が向上することを意外にも見出した。また、同時に、分子量限界の大きな透析膜を用いることにより、および/または透析外液を反応速度が低下した時点で新鮮なものと交換することにより、ポリペプチドの合成量をさらに改善できることを見出した。

【0014】粗細胞抽出液は、細菌(例えば大腸菌等)、菌類(例えば出芽酵母等)、小麦胚芽、ウサギ網赤血球、マウスL-細胞、エールリッヒ腹水癌細胞、HeLa細胞、CHO細胞等の、高いタンパク質合成活性の状態の真核および原核生物細胞からの抽出液であることができる(Clemens, M. J., *Transcription and translation-a practical approach*, (1984), p. 231-270, Henes, B. D. と Higgins, S. J. 編, IRL Press, Oxford)。上記定義のとおり、粗細胞抽出液はリボソーム、tRNAなどのタンパク質合成に必要な成分を含む。粗抽出液の調製は例えばPratt, J. M. ら, *Transcription and translation-a practical approach*, (1984), pp. 179-209, Henes, B. D. と Higgins, S. J. 編, IRL Press, Oxford)に記載の方法を使用できる。具体的には、フレンチプレスによる破碎(Prattら, 上掲)やグラスビーズを用いた破碎(Kimら, 上掲)によって行うことができる。好ましい細胞抽出液は大腸菌S30細胞抽出液である。S30細胞抽出液は、大腸菌A19株(rna, met)から既知の方法、例えばPrattら(上掲)の方法に従って調製できるし、あるいはPromega社やNovagen社から市販されるものを使用してもよい。

【0015】本発明では、上記細胞抽出液はその総タンパク質濃度が増加するように濃縮する必要があるが、濃縮は任意の手段例えば限外濾過(限外濾過遠心を含む)、透析、PEG沈殿などによって行うことができる。濃縮の度合いは、通常1.5倍以上、好ましくは2倍以上である。大腸菌由来の細胞抽出液の場合、限外濾過遠心で1.5~7倍以上、PEG沈殿で1.5~5倍以上まで濃縮可能であるが、4倍を超えるとハンドリングが難しくなる。また、小麦胚芽抽出液の場合、PEG沈殿で10倍の濃縮が可能である(Nakano, H. ら, 上掲)。PEG沈殿による方法では、細胞抽出液にPEG水溶液を混ぜることによりタンパク質、核酸を沈殿させて回収し、これを少量の緩衝液に溶かすことにより濃縮細胞抽出液を得ることができる。透析による濃縮は、例えば後述の実施例1に記載の方法によって実施可能である。すなわち、1つの方法では、振とうまたは攪拌可能な閉鎖系で細胞抽出液を透析内液とし、透析膜(例えば分子量限界1000~14000)を介して透析外液に対して透析を行うことによって得ることができる。ここで、透析外液は、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、ジチオトレイトールを含有する緩衝液と、PEG(例えば#8000)、ショ糖/エピクロルヒドリン水溶性合成共重合体(例えばSIGMA社製のFicoll)等の高分子吸収剤とを含むことができる。高分子吸収剤は水分を吸い出すために必須である。

【0016】大腸菌S30抽出液透析無細胞系は1992年にBecklerら(ASM poster presentation, 1992)が初めて報告し、その後Davisら(上掲)が同じ系を利用した大スケール透析反応を記載しているが、そのいずれにおいてもS30抽出液は未濃縮のものが用いられてきた。また、Davisら(上掲)のFig. 4Cには、透析膜の分子量限界の違いが合成量に与える影響について示されているが、たとえ分子量限界の大きなものを用いてもポリペプチド合成量の向上量は小さい。

【0017】これに対して、本発明の方法では、S30抽出液を濃縮し、その濃縮液を透析内液に用いることによって、および/または分子量限界のより大きい透析膜を使用することによって、および/または反応速度の低下が認められる時点で透析外液を新鮮なものと交換することによって、従来法によるものとはるかに凌ぐポリペプチドの高い生産量を達成することができる。このように優れた効果は、例えば無細胞系でのクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)またはRasタンパク質の生産量の経時変化に関する図2、図3に示されている(実施例3および4参照)。CATの合成量をみると、12時間での反応で5mg/ml、21時間の反応で6mg/mlまで向上した。無細胞系でのCATの合成で従来最も高い生産量は14時間で1.2mg/ml(KimとChoi, 上掲)であるが、本発明

では約4倍以上高い生産量が得られる。

【0018】本発明の方法では、透析膜を介して内液と外液とを隔離して含む振とうもしくは攪拌可能な透析装置を用いることができる。小スケール反応用装置としては、例えばD is p o D i a l y z e r (登録商標) (S p e c t r u m社製) やS l i d e a l y z e r (登録商標) (P i e r c e社製) が挙げられる。また、大スケール反応用装置としては、S p e c t r a / P o r (登録商標) 透析用チューブ (S p e c t r u m社製) を例示できる。

【0019】無細胞タンパク質合成系における透析内液(すなわち、ポリペプチド合成反応液)には、大腸菌S 3 0等の濃縮細胞抽出液の他に、目的のポリペプチドをコードするDNAもしくはRNA(mRNA等)、A T P(アデノシン5'-三リン酸)、G T P(グアノシン5'-三リン酸)、C T P(シチジン5'-三リン酸)、U T P(ウリジン5'-三リン酸)、緩衝液、塩類、アミノ酸、RNアーゼ阻害剤、抗菌剤、必要によりRNAポリメラーゼ(DNAを鋳型として用いる場合)およびtRNA、などを含むことができる。その他、A T P再生系としてホスホエノールビルベートとビルビン酸キナーゼの組合せまたはクレアチンホスフェートとクレアチンキナーゼの組合せ、ポリエチレンギリコール(例えば#8000)、3', 5'-c A M P、葉酸類、RNアーゼ阻害剤、還元剤(例えばジチオトレイトール)、などを含むことができる。一方、透析外液(すなわち、ポリペプチド合成基質溶液)は、透析内液組成から細胞抽出液、RNアーゼ阻害剤、DNAもしくはRNA、RNAポリメラーゼを除いたものが使用できる。例えば、緩衝液、A T P、G T P、C T P、U T P、塩類、アミノ酸、抗菌剤などを含むことができる。添加成分の濃度は任意に選択することができる。

【0020】緩衝液としては、例えばH e p e s - K O H、T r i s - O A c のような緩衝剤を使用できる。塩類の例は、酢酸塩(例えばアンモニウム塩、マグネシウム塩など)、グルタミン酸塩などであり、抗菌剤の例はアジ化ナトリウム、アンビシリンなどである。アミノ酸はタンパク質を構成する20種のアミノ酸である。また、DNAを鋳型として用いる場合にはRNAポリメラーゼを反応系に添加するが、例えばT 7 R N Aポリメラーゼなどの市販の酵素を使用できる。

【0021】本発明においては、透析法を用いた無細胞タンパク質合成系において、大腸菌由来の細胞抽出液ならびにA T P再生系としてのクレアチンキナーゼとクレアチンホスフェートの組合せを含む無細胞タンパク質合成系で該ポリペプチドをコードする核酸の翻訳または転写/翻訳を介して該ポリペプチドを生成し、該ポリペプチドを回収することによって、従来の方法による合成効率を超えるという利点が得られる。このことは図1に結果から明らかであり、この場合細胞抽出液は濃縮

されていても未濃縮であってもよいが濃縮細胞抽出液の方がより好ましい。本発明の実施態様において細胞抽出液は大腸菌S 3 0細胞抽出液であるが、これに限定されない。無細胞タンパク質合成系のその他の成分等の条件は上述したものを適用できる。

【0022】本発明では、ポリペプチドは、上記定義のとおり小ペプチドから大ペプチドに至る任意のものを対象とし、公知のものまたは新規のものを含む。目的のポリペプチドをコードするDNAまたはRNAは、真核または原核生物の細胞もしくは組織からゲノムDNA、m RNAとして周知の方法(フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿、塩化セシウム密度勾配遠心など)で得るか、あるいは、c DNAクローニングで合成・単離することができる。あるいは、ポリペプチドのアミノ酸配列またはそれをコードするヌクレオチド配列が判明している場合には、DNA合成機を用いて化学的に合成することもできる。

【0023】本発明方法の実施においては、上述の透析装置を使用し、透析膜の内部に上記透析内液を、一方その外部に透析外液を入れた、膜の分子量限界に応じて物質が膜を介して移動可能とする閑鎖系を振とうまたは攪拌(回転攪拌など)し、生成した目的ポリペプチドを、透析内液または外液から回収することができる。温度および攪拌速度などの反応条件は、ポリペプチドの種類に応じて任意の条件を使用できる。タンパク質の合成の場合、温度は通常約25~約50°C、好ましくは37°Cであるが、高度高熱菌由来の菌体抽出液を用いる無細胞タンパク質合成系では50°Cを超える温度でもよい。また、振とう速度もしくは攪拌速度は低速、例えば100~200 r p mを使用できる。目的のポリペプチドの生成を監視しながら、反応時間を適当に選択することができる。

【0024】本発明の方法では、上記無細胞タンパク質合成系の透析外液を、反応速度が低下した時点で新鮮なものと交換する場合、および/または、透析膜の分子量限界が10000ダルトンを超えるもの、好ましくは約50000ダルトンおよびそれ以上のものを使用する場合には、ポリペプチドの生産量をさらに高めることができる。

【0025】生成ポリペプチドの精製は、生細胞からの分離と比べて混在する汚染物質の量および種類が格段に少ないため、比較的容易に行うことができる。精製法は、ポリペプチドの性質に応じて従来公知のものを単独にまたは適宜組合せて使用できる。例えば硫酸アンモニウムもしくはアセトン沈殿、酸抽出、アニオンもしくはカチオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、H P L C、電気泳動、クロマトフォーカシングなどの慣用の技術を挙げることができる。生成ポリペプチドの同定および定量は、

活性測定、免疫学的測定、分光学的測定、アミノ酸分析などによって、必要に応じて標準サンプルと比較しながら行うことができる。本発明を実施例でさらに詳しく説明するが、特許請求の範囲に記載の本発明の範囲は以下の実施例によって制限されないものとする。

【0026】

【実施例】実施例1 大腸菌S 30抽出液の調製と濃縮
大腸菌S 30抽出液は、Zubayら(Ann. Rev. Genet. 7: 267-187, 1973)の方法に従って、大腸菌A 19株(rna, met)から調製した。

【0027】15mlの大腸菌S 30抽出液を透析チューブSpectra/Pro 2(分子量限界、12000~14000, Spectrum社製)に入れ透析チューブクランプで封をした後、50mlの溶液B[25gのポリエチレングリコール8000(PEG8000)に溶液A(10mM Tris-HCl(pH 8.2), 60mM CH₃COOK, 14mM Mg(CH₃COO)₂, 1mMジチオトレトール(DTT)を加え、容量を50mlとしたもの]と共にヒートシールバッグ(Heat Seal Bag, Yamamoto社製)に入れてヒートシーラーで密封した。これをローテーターに取り付けて4°Cで45分間、毎分約10回転で回転攪拌した。

【0028】大腸菌S 30抽出液の入った透析チューブを取り出し、溶液の減少に応じて透析チューブクランプの位置を調節した後、4°Cで15分間500mlの溶液Aに対し透析した。上記の方法により、タンパク質濃度で約2倍に濃縮された大腸菌S 30抽出液を得た。

【0029】実施例2 透析を用いた無細胞タンパク質合成法によるCAT(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ)の合成

タンパク質合成反応液(透析内液)の組成は、5.5mM Hepes-KOH(pH 7.5), 5mM DTT, 1.2mM ATP, 各々0.8mMのCTP, GTPおよびUTP, 80mMクレアチンホスフェト, 250μg/mlクレアチンキナーゼ, 4.0% (w/v) PEG8000, 0.64mM 3', 5'-cAMP, 68μM L-(-)-5-フルミル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ葉酸, 175μg/ml E. coli tRNA(Boehringer-Mannheim社製), 210mM グルタミン酸カリウム, 27.5mM NH₄OAc, 10.7mM Mg(CH₃COO)₂, 各々1mMの20種のタンパク質構成アミノ酸, 0.05% NaN₃, 6.7μg/ml pK7-CAT DNA(CAT発現ベクター; Kimら(1996) Eur. J. Biochem., 239: 881-886), 93μg/ml T7 RNAポリメラーゼ, 0.5ユニット/μl RNアーゼ阻害剤(Toyobo社製), 0.3容積の実施例1

からの大腸菌S 30抽出液もしくは濃縮した大腸菌S 30抽出液であった。

【0030】タンパク質合成基質溶液(透析外液)の組成は、透析内液から大腸菌S 30抽出液, RNアーゼ阻害剤, DNA, T7 RNAポリメラーゼを除き, 4.2mM Mg(CH₃COO)₂, を追加したものであった。300μlの透析内液を入れたDispense/Dialyzer CE(分子量限界10000もしくは50000, Spectrum社製)を、3000μlの透析外液の入った15mlチューブに入れ、試験管用振とう培養器で37°C, 160rpmで振とうすることによりタンパク質合成を行った。

【0031】反応液中に含まれるCATタンパク質の定量は、Shaw(1975)Methods Enzymol., p. 735-755に従い以下の方法で行った。すなわち、アセチルコエンザイムAとクロラムフェニコールを基質としてCATによるクロラムフェニコールのアセチル化反応を行い、その結果生じた還元型コエンザイムAを5, 5'-ジチオビス-2-ニトロ安息香酸(DTNB)を用いて発色定量した。37°C, 412nmにおける吸光度の単位時間あたりの増加量よりCATの活性を定量し、これを指標としてCATタンパク質質量を決定した。合成反応開始後、6時間におけるCATの量を図1に示す。濃縮していない大腸菌S 30抽出液を使用した場合は2mg/ml、濃縮したS 30抽出液を使用した場合は3mg/mlの収量を得た。

【0032】実施例3 透析を用いた無細胞タンパク質合成法(反応途中で透析外液を交換)によるCATの合成

30 実施例1の方法で濃縮した大腸菌S 30抽出液を使用して実施例2に記載の反応試験を行った場合の、合成開始後各時間におけるCATの量を図2に示す。反応開始後6時間でCATの合成速度は低下した。同等の反応試験において、反応速度が低下する時刻(ここでは6時間)に透析外液を新たなものに交換したところ、合成反応は長時間継続し、反応開始後12時間で5mg/ml, 21時間では6mg/mlのCATを合成することができた(図2)。

【0033】実施例4 透析を用いた無細胞タンパク質合成法によるRasの合成

40 濃縮した大腸菌S 30抽出液を使用し、pK7-CATの代わりにpK7-Ras(Rasタンパク質の発現ベクター; Kigawaら(1995) J. Biomo 1. NMR, 6: 129-134)を用い、1mMロイシンの代わりに1mM [¹⁴C]-ロイシン(18.5M Bq/mmol, Amersham社製)を用いた他は実施例2と同等の方法にてタンパク質の合成反応を行った。Rasタンパク質の合成量を、フィルター上での5%トリクロロ酢酸を利用しての沈降法を用いて定量した。その結果、Rasタンパク質の合成量は反応開始後

11

6時間で 3 mg/m^3 であった。

【0034】

【発明の効果】上記の実施例の結果に基づき本発明を従来法と比較すると、以下の利点が提供される。

(1) タンパク質合成量

本発明の方法によるタンパク質のCAT合成量 6 mg/m^3 (実施例3) は従来法 (K i mとChoi; 上掲) の値 1.2 mg/m^3 を大きく上回り、工業的なタンパク質生産を行ううえで有利である。本発明で使用した大腸菌抽出液 1 ml あたりのタンパク質の合成量は約 8 mg であり、従来法での値約 3 mg を上回る。したがって、本発明の方法による反応液からは純度の高いタンパク質をより簡便に精製することができる。

【0035】(2) タンパク質合成速度

本発明の方法による合成速度は1時間あたり約 $400 \mu \text{g/m}^3$ であり、従来法の約 $80 \mu \text{g/m}^3$ を大幅に上回る。より短時間に同量のタンパク質を合成できることは、分解を受け易いタンパク質、変性し易いタンパク質

12

*を合成する上で有利である。

【0036】(3) タンパク質合成に要するコスト

本発明の方法において使用した基質溶液 1 ml あたりの合成量は約 $500 \mu \text{g}$ であり、従来法での値 $100 \mu \text{g}/\text{ml}$ を大幅に上回る。このため、本発明の方法では、従来法よりはるかに低いコストでタンパク質を生産することができる。

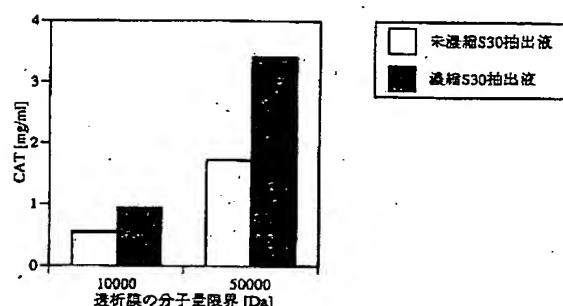
【図面の簡単な説明】

【図1】この図は、透析を用いた無細胞タンパク質合成系における、透析膜の分子量限界と使用する大腸菌S30抽出液の濃縮の有無に対する反応開始6時間後のCATの合成量を示す。

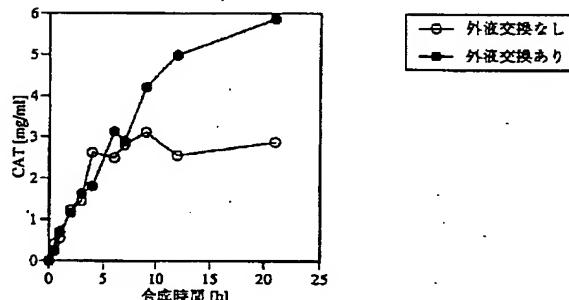
【図2】この図は、透析を用いた無細胞タンパク質合成系における、透析外液交換の有無と合成時間に対するCATの合成量の関係を示す。

【図3】この図は、透析を用いた無細胞タンパク質合成系における、合成時間に対するRasの合成量を示す。

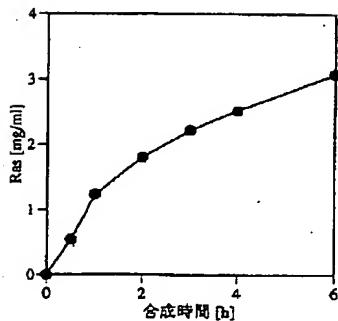
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
(C 1 2 P 21/00 C 1 2 R 1:19)			
(C 1 2 N 1/20 C 1 2 R 1:19)			
(C 1 2 N 9/10 C 1 2 R 1:19)			

(72)発明者 矢吹 孝
埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

F ターム(参考) 4B024 AA20 BA10 BA80 CA04 HA01
4B050 CC03 EE02 EE05
4B064 AG01 CA21 CC22 CD21 DA16
4B065 BB23 BB25 BB26 BB28 BB29
BC20 BC50 CA24 CA29 CA60
4H045 AA20 BA10 DA89 EA60 FA70
GA10 HA05

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.